

## Propagación *in vivo* e *in vitro* de marcela (*Achyrocline satureioides*)

Guariniello, J.; Iannicelli, J.; Peralta, P.; Escandón, A.S.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Genética “Ewald A. Favret”.

Correo electrónico: [guariniello.julian@inta.gob.ar](mailto:guariniello.julian@inta.gob.ar)

### Introducción

*A. satureioides* es un semiarbusto de 0,20 a 0,50 m de altura, muy ramificado, erecto, con hojas lineales o lineal-lanceoladas, alternas, enteras, sésiles, blanquecino-tomentosas, sobre todo en el envés, de hasta unos 5 cm de largo. Capítulos aglomerados en ovillos tupidos cimosos, pequeños, numerosos, con flores dimorfas, las periféricas femeninas en número de 3-6, filiformes; las centrales tubulosas, hermafroditas, en número de 1-2. Fruto aquenio con papus blanco, áspero (Retta *et al.*, 2012).

También conocida como marcela hembra, vira vira, wira wira (Quechua), huir huir (Bolivia), macela (Brasil), yatey caa (Guarani), marcela blanca (Uruguay), se halla distribuida en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y en el noreste y centro de Argentina. Principalmente, prospera en zonas de climas húmedos y suelos arenosos de las Sierras de San Luis, Córdoba y Tandil, y en la zona costera de Buenos Aires (Giangualani, 1976).

En la medicina popular se la utiliza en infusiones como digestiva, carminativa, antiespasmódica, colagoga, eupéptica y emenagoga. Además se le atribuye la propiedad de reducir el colesterol. La elaboración de medicamentos fitoterápicos de uso oral de marcela se realiza a partir de sus hojas y flores (Disp. N° 2673/99, ANMAT). En este sentido, la especie está incluida en el Código Alimentario Argentino desde 1995 y es oficial en la Farmacopea Nacional de Brasil. A partir de la caracterización fitoquímica de la especie, realizada recientemente por Retta *et al.* (2012), se ha redactado una propuesta de monografía para ser incluida en la próxima edición de la Farmacopea Argentina.

Asimismo, se la utiliza en la elaboración de cremas cosméticas por su alto contenido de flavonoides y antioxidantes (Natura Cosméticos, 2011) y se la menciona con potencial ornamental para el cultivo en maceta, jardines rocosos y borduras (Alonso *et al.*, 2009).

Sin embargo, su principal uso comercial es como aromatizante en la industria de las bebidas; específicamente, forma parte en la composición de numerosos “amargos” y bebidas alcohólicas, como el aperitivo Gancia™.

*A. satureioides* es una especie que está siendo ampliamente estudiada, de hecho existen numerosos trabajos realizados que se enfocan, tanto al estudio de la actividad biológica y medicinal de sus compuestos, como orientados al ajuste de variables para su domesticación (Davies, 1999), propagación vegetativa *in vivo* e *in vitro* (Kotik *et al.*, 2014; Severin *et al.*, 2008; Gattuso *et al.*, 2007), estudios de la germinación de semillas (Serdiuk *et al.*, 2000), e incluso mejoramiento. En este sentido, recientemente, la Universidad Estatal de Campiñas, Brasil, ha registrado el cultivar comercial CPQBA 2, obtenido por mejoramiento genético clásico (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, 2017).

Por el momento, el tamaño y la distribución de las poblaciones naturales de *A. satureioides* permiten a la industria licorera proveerse de tal materia prima a partir de la recolección silvestre. Sin embargo, la demanda creciente de esta especie tornará insostenible su aprovechamiento e incrementará su vulnerabilidad. En el INTA se están realizando algunas prácticas de domesticación y cultivo, no obstante no existe un programa nacional de mejoramiento ni explotaciones que se dediquen a su producción.

### Objetivo

Ajustar un protocolo eficiente de micropropagación *in vitro* de *A. satureioides*, a fin de establecer una plataforma tecnológica que permita la propagación masiva de la especie y la consolidación de los trabajos de domesticación y mejoramiento iniciados por nuestro grupo.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se cuenta con el clon denominado como M1-5, obtenido en una colecta realizada por el grupo de aromáticas nativas del IRB en la localidad de Dique Cruz de Piedra (66° 12´ 45.8" S, 33° 15´ 59" O, 910 m s. n. m.), San Luis. El clon se propagó agámicamente para conformar un stock de plantas madres, las cuales se mantuvieron en el invernáculo bajo condiciones semicontroladas de luz y temperatura.

### Metodología

#### Propagación por esquejes *in vivo*

Para el establecimiento de un stock de plantas madres de marcela se realizó la propagación vegetativa a partir de estacas. Para ello se obtuvieron segmentos binodales provenientes de tallos jóvenes del clon denominado M1-5. Luego se indujo el enraizamiento de los esquejes mediante la aplicación basal de ácido indolbutírico (IBA) 3000 ppm en polvo. Las estacas se dispusieron en macetas con sustrato de enraizamiento (TerraFertil®), se cubrieron con bolsas plásticas transparentes y dispusieron en invernáculo en condiciones semicontroladas de luz y temperatura. En forma paulatina se retiraron las bolsas para la aclimatación de los plantines. Aproximadamente a los 30 días, los esquejes enraizados se pasaron a macetas individuales con sustrato de trasplante (GrowMix, TerraFertil®) y se fertilizaron con Akaphos rojo 1 g/l.

#### Propagación *in vitro*

Se cosecharon tallos jóvenes de las plantas madres mantenidas en invernáculo estándar. Las que fueron tratadas periódicamente con fungicidas (Trigal) en la dosis recomendada por el proveedor como control fitosanitario.

Los explantos fueron desinfectados superficialmente sumergiéndolos en alcohol 70° durante 1 min, luego en NaClO al 2 % con Tween 20 al 0,1 %, en agitación constante durante 25 min (Rosso *et al.*, 2015). Finalmente, se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril, secaron con papel de filtro y acondicionaron para su introducción. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones de flujo laminar.

A continuación, los explantos se introdujeron en frascos conteniendo el medio MS, semisólido (0,7 % agar), enriquecido con 3 % de sacarosa. El pH del medio fue ajustado a 5,8 con KOH 1N y el medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión por 20 minutos. Los explantos sembrados se llevaron a la sala de cultivo a 25±2 °C y un fotoperíodo de 16 h de luz (30 µE/m<sup>2</sup>.s). Los repiques se realizaron cada 15-20 días. Se estimó el porcentaje de contaminación y la supervivencia de los explantos.

Una vez establecido el cultivo, 20 segmentos binodales del clon M1-5, fueron transferidos a dos medios basales: MS (Murashige y Skoog, 1962) y WPM (Lloyd y McCown, 1981) a fin de comparar su respuesta a medios de cultivo base con diferente fuerza iónica.

Posteriormente, utilizando la misma fuente de explantos, se realizó un experimento factorial para comparar la respuesta *in vitro* de *A. satureioides* frente a concentraciones crecientes 0; 0,5; 2,5 y 5,0 µM de 6-bencilaminopurina (BAP), con y sin 0,05 µM ácido α-naftalenacético (ANA) en todas las combinaciones posibles. Se utilizó WPM, semisólido (0,7 % agar), enriquecido con 3 % de sacarosa, como medio de cultivo. El ensayo se ajustó a un diseño completo al azar sembrando dos explantos por frasco con 10 frascos por tratamiento (repeticiones). Se realizó el seguimiento periódico de los explantos durante 35 días, registrando la proliferación de yemas y brotes, la presencia de callo y el número y largo de las raíces. Los datos obtenidos fueron estudiados por análisis de variancia y comparación de medias mediante la prueba de Tukey al 5 % de significancia. A los 75 días de iniciado el ensayo, se midió el largo total de las raíces y la altura de 10 plántulas (no se midieron los brotes de forma individual) desarrolladas a partir de yemas preexistentes en los tratamientos libres de BAP (tratamiento control y tratamiento conteniendo solo ANA). Luego se llevaron a aclimatación en invernáculo utilizando vasos plásticos y sustrato para trasplante (GrowMix, TerraFertil®). A su vez, las plántulas desarro-

lladas en los demás tratamientos, o segmentos binodales extraídos de estas fueron transferidos a un medio sin hormonas para su enraizamiento. A los 30 días, las plántulas enraizadas se llevaron a aclimatación y se evaluó su supervivencia.

## Resultados

La totalidad de los esquejes de marcela propagados *in vivo* enraizaron y se desarrollaron en forma satisfactoria en las condiciones probadas. Estos clones fueron utilizados como fuente de explantos para los ensayos llevados a cabo en este estudio (Figura 1).

Los explantos provenientes de plantas madres M1-5, desinfectados e introducidos *in vitro* registraron un 35 % de supervivencia. Se observaron pérdidas por contaminación, principalmente con hongos (35 %) y bacterias (28 %), y algunos casos de necrosis. Los explantos establecidos demostraron un crecimiento satisfactorio.



Figura 1. Plantas madres M1-5 de *Achyrocline satureioides* en invernáculo.

En los primeros estadios del cultivo se observó, tanto el desarrollo de las dos yemas axilares preexistentes y la aparición de hojas como el enraizamiento del tallo. Luego se observó la elongación de los brotes y una mayor separación de los entrenudos. A los 30 días de cultivo se contabilizaron 2-3 nudos por tallo (Figura 2). Esto permitió la obtención de nuevos explantos y la multiplicación de material *in vitro*.

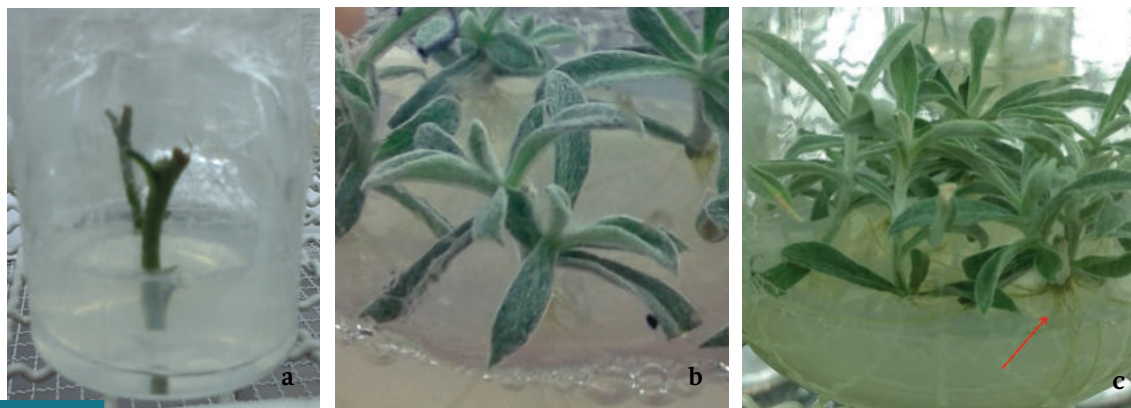
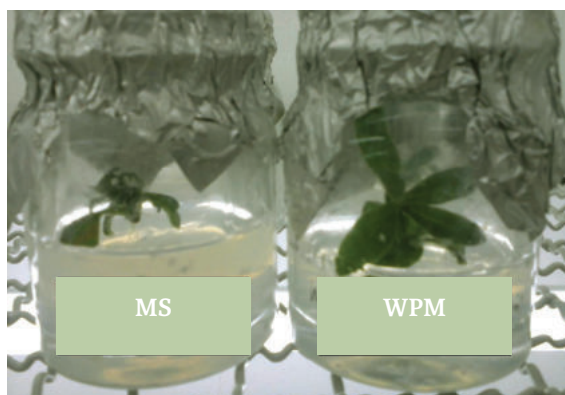


Figura 2. Segmentos binodales del clon M1-5 de *A. satureioides* en el medio MS, al inicio (A), 10 días (B) y 30 días (C) de cultivo.

A continuación, se corroboró cualitativamente que la utilización del medio WPM como medio basal permite obtener plántulas *in vitro* de mayor tamaño y mejor aspecto con respecto al medio MS, a igualdad de tiempo (Figura 3). Por lo tanto, se utilizó el WPM para el establecimiento, la multiplicación de material *in vitro* y los ensayos subsiguientes.



**Figura 3.** Segmentos binodales de *A. saturoioides* luego de 15 días de cultivo sobre medio base MS y WPM, respectivamente.

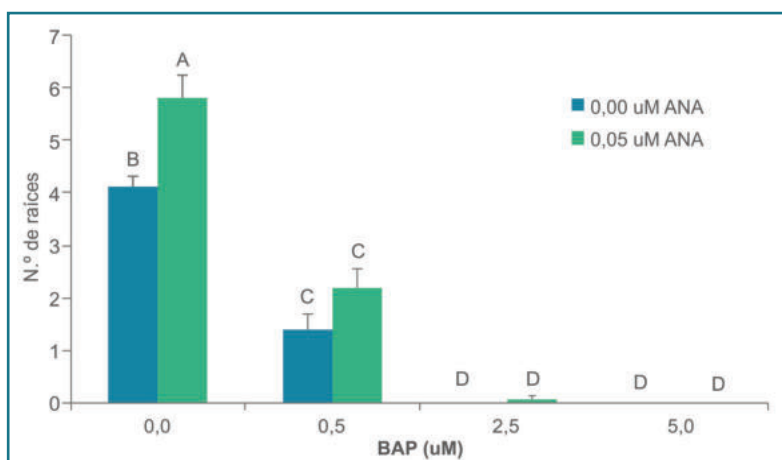
Para iniciar el estudio de respuesta a la utilización de ANA y BAP, segmentos binodales de aproximadamente 1,0 cm de longitud fueron transferidos a los diferentes tratamientos ensayados.

A los 8-9 días de la siembra se observó en todos los explantos activación y movimiento en las yemas. Asimismo, se observó que en el 98 % de los explantos de los tratamientos control (0  $\mu$ M BAP), con y sin ANA, se indujo el enraizamiento. Por su parte, en los tratamientos conteniendo 0,5  $\mu$ M BAP solo enraizaron el 50 % de los brotes y ninguno en los de 2,5 y 5,0  $\mu$ M BAP. En estos dos últimos tratamientos se observó un engrosamiento en la base de los explantos (Figura 4).



**Figura 4.** Segmentos binodales del clon M1-5 de *A. saturoioides* en medio WPM suplementado con 5,0  $\mu$ M BAP a 8 días de cultivo. La flecha indica el engrosamiento en la base del explanto.

Por un lado, a los 14 días se observó que en una mayor concentración de BAP se indujo un menor número de raíces, mientras que, en presencia de ANA, la cantidad de raíces inducidas fue mayor, ocurriendo interacción entre los factores ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). En este sentido, el tratamiento con 0,05  $\mu$ M ANA y sin BAP es el que produjo mayor número de raíces (5-6). Del mismo modo, se observó que concentraciones crecientes de BAP redujeron la longitud de estas (dato no mostrado).

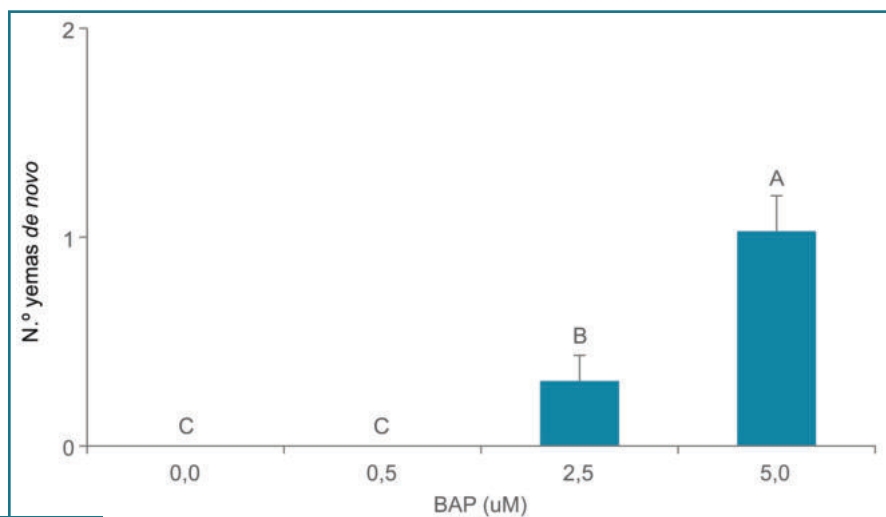


**Figura 5.** Número de raíces de explantos a 14 días de cultivo en el medio WPM suplementado con ANA (0; 0,05 µM) y BAP (0; 0,5; 2,5 y 5,0 µM). Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey ( $p > 0,05$ ).  $n=20$ .

Por otro lado, en los tratamientos de mayores concentraciones de BAP se detectaron hojas deformadas y el desarrollo de callo en la base de algunos explantos.

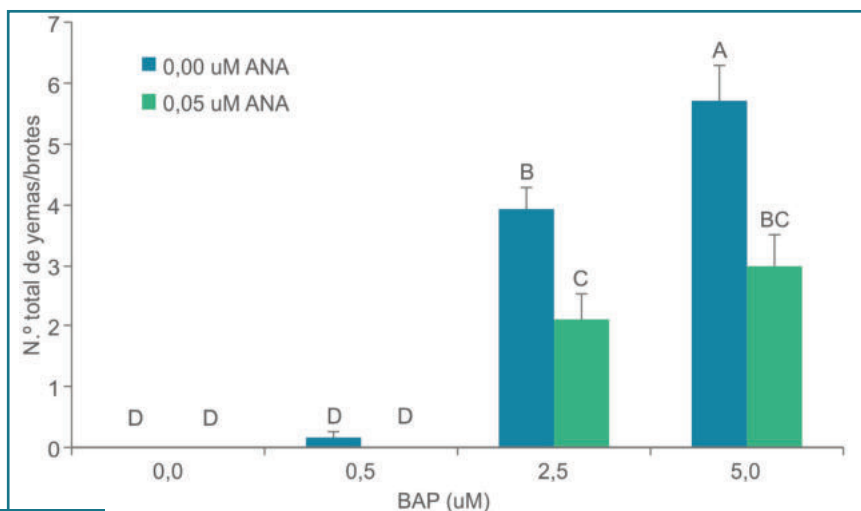
A los 28 días se observó la presencia de yemas generadas *de novo* en la base de los explantos en los tratamientos conteniendo las mayores concentraciones de BAP, principalmente el suplementado con 5,0 µM ( $p < 0,05$ ). Dado que el agregado de ANA no modificó la respuesta ( $p = 0,89$ ), se comparó el promedio de los tratamientos con y sin ANA para cada concentración de BAP (Figura 6). Sin embargo, a los 35 días de cultivo se observó interacción en la respuesta entre las concentraciones de ANA y BAP ( $p < 0,05$ ), siendo el tratamiento con 5,0 µM BAP y sin ANA el que produjo mayor cantidad de yemas/brotes totales, esto es tanto de meristema preexistentes como de meristemas *de novo* (Fig. 7).

En los tratamientos suplementados con BAP se observó un ensanchamiento en la base del explanto (ver Fig. 4) y el desarrollo de callos con puntos de posible crecimiento meristemático (Fig. 8). Sin embargo, los incipientes primordios de hoja generados en el callo, que se desarrollaron sumergidos en el medio de cultivo, mostraron vitrificación, posterior degeneración y, finalmente, necrosaron.

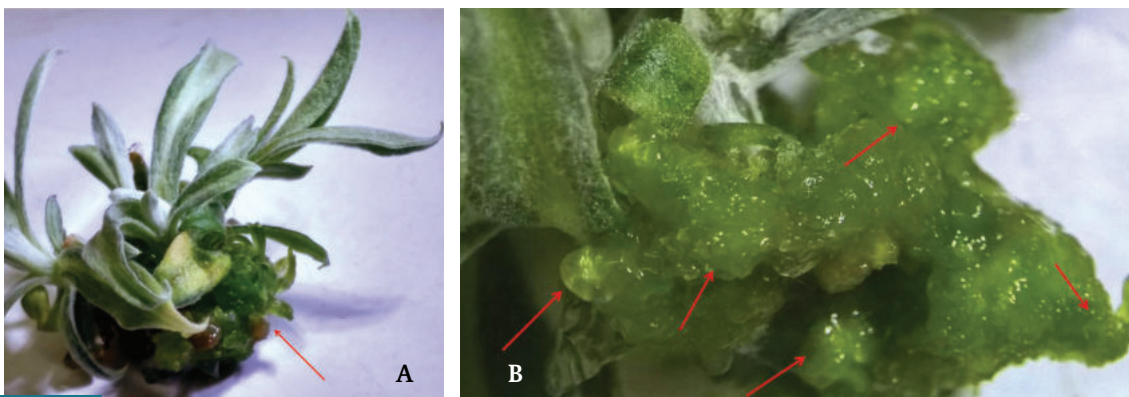


**Figura 6.** Yemas generadas *de novo* en la base de los explantos a los 28 días de cultivo en el medio WPM suplementado con 0; 0,5; 2,5 y 5,0 µM BAP. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey ( $p > 0,05$ ).  $n=40$ .





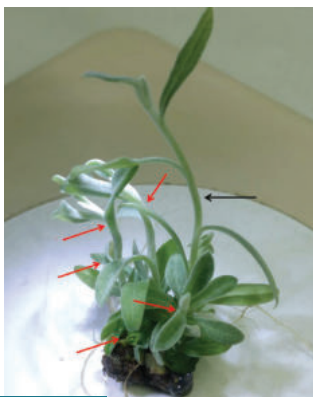
**Figura 7.** Comparación del número total de yemas/brotes (generadas *de novo* + preexistentes) en explantos cultivados en el medio WPM suplementado con ANA (0; 0,05 µM) y BAP (0; 0,5; 2,5 y 5,0 µM) a los 35 días. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey ( $p > 0,05$ ).  $n=20$ .



**Figura 8.** A. Vista general de un segmento binodal en medio WPM con 5,0 µM BAP a 28 días de cultivo. La flecha indica el callo desarrollado en la base del explanto. B. Vista ampliada de la base del explanto mostrando el desarrollo de callo basal. Las flechas indican posibles puntos meristemáticos.

A los 75 días de iniciado el ensayo, las plántulas desarrolladas en los tratamientos libres de BAP y que crecieron en presencia de ANA, presentaron tallos más largos (61,75 vs. 49,11 mm) que las del tratamiento control, sin embargo, las diferencias fueron no significativas ( $p=0,057$ ). Por su parte, las raíces desarrolladas por los brotes de ambos tratamientos mostraron una longitud similar (96 mm, en promedio). Una vez enraizadas las plántulas fueron transferidas a invernáculo para su aclimatación. A la semana de realizada la transferencia todas las plántulas mostraban una buena respuesta.

A los 50 días de cultivo se puede observar el desarrollo del brote principal y la aparición brotes adventicios surgiendo desde la base del explanto (Figura 9). Todos los brotes originados *de novo*, al ser repicados a WPM libre de reguladores del crecimiento, evidenciaron un 100 % de enraizamiento luego de una semana en esta condición (Figura 10). Finalmente, estos fueron transferidos a macetas plásticas en condiciones de invernáculo estándar para su aclimatación. A los 15 días las plántulas *ex vitro* presentaban un 100 % de supervivencia (Figura 11).



**Figura 9.** Brotes generados a partir de yemas preexistentes (flecha negra) y *de novo* (flechas rojas) a 50 días de cultivo en el medio WPM con 5,0  $\mu$ M BAP.



**Figura 10.** Brotes regenerados *de novo* enraizados previo a su aclimatación en invernáculo.



**Figura 11.** Aclimatación de explantos *ex vitro* a 15 días del trasplante en Grow Mix® en el invernáculo.

## Conclusiones

En las condiciones de trabajo aquí establecidas la utilización de WPM como medio basal produjo mejor calidad de plántulas.

La aplicación de 5,0  $\mu$ M BAP generó un mayor número de brotes y yemas *de novo* a igualdad de tiempo, por lo que se estableció como la dosis óptima de trabajo.

Los tallos generados de novo y repicados al medio basal libre de hormonas enraízan completamente en una semana, independientemente del tratamiento hormonal previo y sin la necesidad del agregado de auxinas al medio de cultivo.

El genotipo utilizado mostró buena aptitud para el cultivo *in vitro* de tejidos.

Fue posible ajustar un protocolo de micropropagación que permitirá establecer una plataforma tecnológica, ya sea para la producción de plantines de clones selectos, o bien para la aplicación de herramientas biotecnológicas en el desarrollo de nuevo germoplasma de *A. satureioides*.

Cabe recordar que el método de aprovechamiento extractivista no es sostenible en el tiempo. De continuar este sistema es lógico concluir que la marcela seguirá el camino de otras especies aromático-medicinales nativas que se encuentran en serio riesgo de extinción.

## Bibliografía

- BONNECARRÈRE, V.; BERNÁ, L.; CASTILLO, A. 2009. Establishment of micropropagation and cell suspension culture conditions on *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (Asteraceae). *Agrociencia* 13(1), 1-6.
- DAVIES, P. 1999. Experimentation on the cultivation of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) D. C. and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. in Uruguay. En: GILBERTI, G.; CRAKER, L.; LORENZ, M.; MATHÉ, A.; GIULIETTI, A. (Eds.). II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post-Harvest Techniques, Biotechnology. ISHS Acta Horticulturae 502. Mendoza, Argentina.
- GATTUSO, S.; SCANDIZZI, A.; BUSILACCHI, H.; DI SAPIO, O.; SEVERIN, C. 2007. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.: propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales. *RIFCA* 11, 45-50.
- GIANGULANI, R. 1976. Las especies argentinas del genero *Achyrocline* (Compositae). *Darwiniana* 20, 549-576.
- KOOTIK, D.; SANSBERRO, P.; LUNA, C. 2014. Adventitious bud formation and plantlet regeneration of *Achyrocline satureioides*-A multipurpose medicinal plant. *European Journal of Medicinal Plants* 4(10), 1200-1209.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30, 421-427.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S.; BANDONI, A. 2012. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products* 38, 27-38.
- ROSSO, C.; IANNICELLI, J.; ESCANDÓN, A.S. 2015. Ajuste de la micropropagación *in vitro* de marcela. Segundas Jornadas Rioplatenses de Flora Nativa, diálogos, integración y tendencias. Buenos Aires.
- SEVERIN, C.; DI SAPIO, O.; SCANDIZZI, A.; TALEB, L.; GIUBILEO, G.; GATTUSO, S. 2008. Efecto de algunos fitorreguladores y estudio histológico sobre la regeneración *in vitro* de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *BLACPMA*, 7(1), 18-24.